

УДК 547.9:612.397:678.012

О.Ю. Галкін, Л.Б. Бондаренко, О.М. Дуган

СТВОРЕННЯ І ВИКОРИСТАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ФОРМ НА ОСНОВІ РЕЦЕПТОР-ОПОСЕРЕДКОВАНОГО ЕНДОЦИТОЗУ БІОЛОГІЧНО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Вступ

Обов'язковими критеріями, якими зумовлюється можливість застосування фармацевтичного препарату в клінічній практиці, є його ефективність, безпечність і якість, які встановлюються за результатами відповідних досліджень (біоеквівалентності, фармакологічних, токсикологічних, клінічних випробувань та досліджень *in vitro*). Ефективність і безпечність лікарського засобу адресується до ефективності його дії на ту чи іншу клітинну мішень та збереження високого рівня активності при застосуванні *in vivo*.

Довгий час при розробці нових препаратів невинувато мало уваги приділялося питанню доставки діючої речовини до мішені. В той же час, цілком зрозуміло, що успіх може мати лише препарат, який одночасно буде характеризуватися високою активністю *in vitro*, біодоступністю та специфічністю. Слід зазначити, що сучасні знання про механізми внутрішньоклітинного транспорту і молекулярної організації клітинної поверхні дають можливість розробляти нові, більш ефективні, технології направленої доставки лікарських субстанцій. Використання таких підходів має на меті підвищити специфічність дії препаратів і тим самим знизити їх токсичність, а також зменшити концентрації діючих речовин [1, 2].

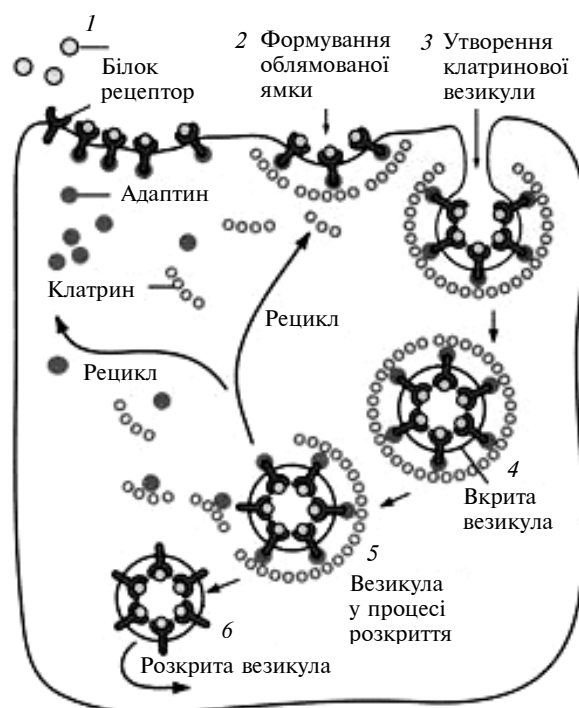
Системи цілеспрямованої доставки — це лікарські форми, що доставляють лікарську речовину в уражену ділянку організму, до органу, тканини, клітини-мішені в точно регульованих кількостях та забезпечують кероване вивільнення активної субстанції. У системах доставки лікарська речовина перебуває у взаємодії з іншими речовинами або з пристроєм для введення речовини. Внаслідок вибіркового накопичення лікарської субстанції в патологічному вогнищі підвищується її ефективність, зменшується витрата, усуваються можливі небажані ефекти на здорові органи і тканини.

Постановка задачі

Мета статті полягає в аналізі підходів до підвищення селективності фармацевтичних препаратів, які базуються на наведеному транспортуванні діючих речовин до клітин-мішеней за допомогою використання рецептор-опосередкованого ендоцитозу.

Уявлення про рецептор-опосередкований ендоцитоз

Залежно від механізму поглинання клітиною різних макромолекул і частинок ендоцитоз можна поділити на конститутивний (або ж рідинно-фазний) та рецептор-опосередкований. У першому випадку має місце невибірковий процес, при якому концентрація речовин, що поглинаються у складі везикул, відповідає концентрації речовин у позаклітинній рідині. Опосередкований рецепторами ендоцитоз (рисунк) являє собою виключно вибіркового концентрувальний механізм, що дає можливість клітинам захоплювати великі кількості специфічних лігандів без поглинання великого об'єму позаклітинної рідини [3–6]. При цьому поглинаються макромолекули, для яких на плаз-



Етапи ендоцитозу, опосередкованого рецепторами: зв'язування ліганду з рецептором (1), формування облямованої ямки (2), утворення клатринової везикули (3), внутрішньоклітинна утилізація (4–6)

малемі є обмежена кількість зв'язувальних ділянок. Ці рецептори мають високу спорідненість до певних речовин. Вони вибірково поглинають їх із середовища клітини і концентрують. При цьому рідина і розчинені в ній сторонні молекули, які не зв'язуються з рецепторами, майже не поглинаються. Так забезпечується ефективне надходження специфічних молекул у клітину. Везикули, які утворюються при такому ендоцитозі, формуються в місці інвагінацій плазмалеми, що з боку цитоплазми вкрита волокнистим матеріалом — мембранним білком клатрином. Заздалегідь на мембрані утворюються облямовані клатрином ямки, які можуть займати до 2 % поверхні деяких клітин. За допомогою облямованих ямок, в яких розташовуються відповідні рецептори, інтерналізується ряд речовин (наприклад, ліпопротеїни низької густини), фактори росту, гормони тощо [1].

Використання білкових векторів, специфічних до клітинних рецепторів

У розробці протиракових препаратів великого поширення набув підхід з використанням гібридних ковалентно зв'язаних кон'югатів типу “білковий вектор—хіміопрепарат”. Вибірковість дії кон'югатів досягається або за рахунок наявності на поверхні пухлинних клітин специфічних рецепторів, які розпізнаються векторним білком, або антитілом, або за рахунок більш високого рівня експресії рецепторів векторного білка на поверхні пухлинних клітин порівняно з нормальними. В ряді публікацій наведено дані про успішне застосування цитотоксичних кон'югатів, створених на основі цитотоксичних антибіотиків і векторних молекул, які здійснюють направлену доставку антибіотика в пухлинні клітини або ендотеліальні клітини судин пухлини [7]. Як вектори активно використовуються онкофетальні білки, трансферрин, моноклональні антитіла до специфічних пухлинних антигенів, гормоноподібні пептиди тощо.

Кон'югацію препарату з білковим вектором може бути здійснено кількома способами: за допомогою хімічного зшивання (у простому випадку — дисульфідний або тіоефірний зв'язок), поліетиленглікольного або поліпептидного лінкера, авідин-біотинової технології. Більш детально методи біокон'югації описано в праці [8]. У будь-якому випадку спосіб кон'югації має задовольняти два основні критерії: високий вихід реакції і можливість внутрішньоклітинного розщеплювання. Остання вимога може

й не виконуватися. В такому випадку “незалежність” препарату від вектора зумовлена значною довжиною лінкера. Для створення таких лінкерів зазвичай використовується ПЕГ, маса якого може досягати 2–3 кДа [9].

Як протипухлинні препарати, як правило, використовуються цитотоксичні антибіотики, індуктори апоптозу та інші препарати.

Очевидно, що специфічність дії кон'югата визначатиметься передусім структурою і типом білкового вектора.

Трансферрин-трансферриновий рецептор. Як відомо, транспортування заліза (Fe^{3+}) в організмі здійснюється в комплексі з глобуліновим білком трансферрином (Trf). Транспортування заліза в клітину відбувається в результаті ендоцитозу, опосередкованого взаємодією Trf із своїм рецептором (TFR) [10, 11]. Трансферрин широко використовується як білковий вектор для направленої доставки протиракових препаратів, білків і генів до пухлинної клітини, для якої характерний підвищений рівень експресії TFR. Trf-специфічна внутрішньоклітинна доставка досягається кон'югацією даного вектора із низкою протипухлинних препаратів (doxorubicin, daunorubicin) і білкових токсинів (CRM107, ricin) [12]. Використання таких конструкцій дає можливість істотно зменшити токсичність хіміотерапії і певною мірою протистояти механізмам набутої резистентності ракових клітин.

Гормони і їх рецептори. Як вектори не менш ефективно можуть бути використані пептидні гормони, до яких є рецептори на поверхні клітини. Зокрема, встановлено, що для рецепторів декапептиду гонадоліберину спостерігається підвищена експресія в пухлинних клітинах при розвитку раку молочної залози, яєчників і простати [13, 14]. Тому гонадоліберин може бути використаний для направленої доставки ліків до таких злоякісних утворень. Так, для кон'югата, що складається з гонадоліберину, ПЕГ і камптотецину (camptothecin), була показана висока протипухлинна активність на мишах. Дана конструкція була нетоксичною, і при цьому не спостерігалось істотного фізіологічного ефекту на репродуктивні функції випробовуваних тварин, пов'язаного з підвищенням концентрації гонадоліберину [13].

Великий інтерес становлять також інсулінові рецептори, виявлені практично у всіх тканинах організму [15]. Зокрема, багато пухлинних клітин характеризуються високим ступенем експресії рецепторів до інсуліну [16–19].

У структурі кожного гормону можна виділити центри, які визначають їх взаємодію тільки з клітинами-мішенями [20]. У зв'язку з цим уявляється за можливе створення ліпосомального вектора, заснованого на структурі ділянки молекули інсуліну, який відповідає за взаємодію з рецептором. З літературних даних відомо, що за зв'язування і прояв біологічної активності відповідає район на С-кінцевих ділянках А- і В-ланцюгів молекули інсуліну [21].

У праці [22] описано синтетичний декапептид, який відповідає своєю амінокислотною послідовністю 19–26 амінокислотним залишкам В-ланцюга і 20–21 залишкам А-ланцюга молекули інсуліну, зв'язаних між собою пептидним зв'язком. Створено також і короткий фрагмент, який відповідав своєю амінокислотною послідовністю 23–26 амінокислотним залишкам В-ланцюга і 20–21 залишкам А-ланцюга молекули інсуліну, сполучених між собою пептидним зв'язком [22]. У його склад входить гідрофобна ділянка С-кінця В-ланцюга молекули інсуліну. Вона є найважливішою областю, що відповідає за зв'язування з рецептором та утворення димерів [23]. Обидва пептиди було ацильовано по N-кінцю ефіром пальмітинової кислоти. Після цього вони вбудовувались у ліпідний бішар. Отримані ацильовані пептиди, введені до складу ліпосом, здатні *in vitro* стійко зв'язуватися з інсуліновим рецептором клітин феохромоцитом шура PC12, що далі веде до рецептор-опосередкованого ендоцитозу ліпосом [22].

Онкофетальні білки. Як молекулярний вектор для доставки препаратів у пухлинні клітини можуть бути використані також деякі онкофетальні білки, зокрема α -фетопротейн (АФП). Перевага їх використання полягає у відсутності імуногенних властивостей, високій афінності до рецепторів і високому рівні експресії рецепторів на пухлинних клітинах [24, 25]. Показано, що рецептори АФП експресуються на поверхні переважної більшості пухлинних клітин незалежно від типу пухлини, тоді як у нормальних клітин організму їх нема або вони є в незначних кількостях [26].

Перелічені вище експериментальні дані щодо рівня експресії рецепторів АФП і високої швидкості ендоцитозу дали можливість зробити припущення про високу вибірковість доставки кон'югатів АФП з цитотоксичними препаратами в пухлинні клітини.

Було створено і вивчено кон'югати АФП з різними агентами хіміотерапії: фталоціаніна-

ми, хлоринами, алкалоїдами і препаратами антрациклінового ряду. Результати досліджень показали, що використання АФП як вектора дало можливість збільшити цитотоксичну активність відносно ліній пухлинних клітин більшості досліджуваних препаратів [26–33]. Високою протипухлинною активністю характеризувалися кон'югати АФП з доксорубіцином, а їх цитотоксична активність відносно резистентних до антибіотика пухлинних клітин у багато разів перевищувала цей показник для вільного доксорубіцину [26–28]. Дослідження, проведені на моделях солідних пухлин мишей, показали, що кон'югати АФП з цитотоксичними препаратами мають більш виражену інгібувальну дію щодо пухлин і порівняно з вільними антибіотиками значно подовжують термін життя експериментальних тварин [26, 27]. Позитивні результати отримано також при використанні кон'югатів епідермального фактора росту (ЕФР) і рецепторзв'язувального фрагмента ЕФР з протипухлинними препаратами [30–37].

Як альтернативний підхід можуть бути розглянуті результати розробки препаратів направленої дії у вигляді кон'югатів АФП з антисмисловими олігонуклеотидами (АСОН) до мРНК генів, які відіграють ключову роль у регуляції клітинної проліферації і апоптозу. Експериментальні дослідження з використання АСОН для інгібування трансляції мРНК генів, гіперекспресія яких призводить до пухлинної трансформації, продемонстрували їх високу специфічність щодо своїх мішеней [38, 39]. На відміну від більшості препаратів хіміотерапії АСОН легко піддаються біодеградації і видаленню з організму. Для запобігання їх розщеплювання ендо- і екзонуклеазами застосовуються модифіковані олігонуклеотиди, з яких найбільш перспективними визнано фосфоро-тіоатні похідні [2]. Однак існує ряд проблем, пов'язаних з недостатньою ефективністю їх доставки в пухлинні клітини.

Моноклональні антитіла та імуноліпосом. Найширше як вектори використовуються моноклональні антитіла (МКАТ) до різних рецепторів на поверхні ракових клітин (TRFR, рецептор фактора росту епітелію, CD-рецептори). Вироблення таких МКАТ лежить в основі дії онковакцин. Крім того, іноді використовуються радіомічені МКАТ, які зв'язуються з клітиною і викликають її загибель за рахунок наявності в їх структурі радіонуклідів. Також МКАТ часто кон'югуються з цитотоксичними антибіотиками та іншими біологічно активними ре-

човинами за допомогою різних лінкерів (авідин-біотин, ПЕГ тощо) [40]. Використання кон'югатів на основі МКАТ до рецепторів часто буває ефективнішим, ніж використання векторів як природних лігандів. Так, наприклад, Tfr характеризується обмеженою здатністю проникати через гематоенцефалітний бар'єр, що не дає можливості використовувати його в терапії онкологічних захворювань мозку. В той же час антитіла до TFRR безперешкодно проникають до різних тканин мозку [41].

Оригінальним напрямком створення систем цілеспрямованої доставки лікарських препаратів є імуноліпосоми, які являють собою ліпосоми з прикріпленими моноклональними антитілами [42]. МКАТ забезпечують специфічне зв'язування ліпосом з антигенпозитивними клітинами, а ліпосоми несуть відповідний гідрофобний або гідрофільний препарат хімотерапії. Зараз розрізняють три типи імуноліпосом: А, В і С [43]. У імуноліпосомах типу А МКАТ ковалентно зв'язані із звичайними ліпосомами за допомогою короткого лінкера. Тип В — це вже ПЕГ-ліпосоми, в яких МКАТ також ковалентно зв'язані з ними через короткий лінкер. Тип С (Pendant-type PEG-immunoliposomes) є стерично стабілізованими ПЕГ-ліпосомами, в яких МКАТ прикріплені до дистального термінального кінця ПЕГ.

За допомогою ліпосом типу А було переконливо продемонстровано, що імуноліпосоми ефективніше доставляють ліки в клітини-мішені порівняно із звичайними ліпосомами в тестах як *in vitro*, так і *in vivo* [44]. Проте зв'язування імуноліпосом з клітинами-мішенями *in vivo* виявилось більш складним. Вивчення імуноліпосом *in vivo* показало, що прикріплення до ліпосом антитіл підсилювало їх захоплення мононуклеарами РЕС. Ефективність скріплення імуноліпосом із клітинами-мішенями залежала від щільності антитіл на поверхні ліпосом. Захоплення імуноліпосом клітинами РЕС і ендотеліальний бар'єр, що розділяє судинне русло від пухлинної тканини, спонукали дослідників до створення нового типу ліпосом. Це привело до конструювання стерично стабілізованих імуноліпосом з подовженим періодом циркуляції в крові.

У перших дослідженнях із створення довгоциркулюючих імуноліпосом до стерично стабілізованих ліпосом, що містять фосфоліпіди з модифікованими ПЕГ головними групами, антитіла були прикріплені через короткий гідрофільний лінкер близько до поверхні ліпосом

(ліпосоми типу В) [45]. Ці ліпосоми зберігали властивість довготривалої циркуляції, але взаємодія з клітинами-мішенями була пригнічена через блокаду ПЕГ [46]. Пізніше МКАТ були прикріплені до дистальних кінців ланцюгів ПЕГ, зв'язаних з ліпосомами (ліпосоми типу С). Це сприяло збереженню здатності стерично стабілізованих ліпосом специфічно зв'язуватися з клітинною поверхнею клітин-мішеней і бути захищеними від захоплення мононуклеарами РЕС [47]. На сьогодні для ковалентного зшивання МКАТ до термінальних кінців ПЕГ з метою отримання стабільного зв'язку антитіл з ПЕГ використовуються три методи кон'югування: через тіоефірний зв'язок [48], амідні групи [43] і гідрозони [49].

Слід зазначити, що до антитіл, використовуваних у конструюванні імуноліпосом, ставились певні вимоги. МКАТ повинні зберегти свою специфічність при кон'югації з ліпосомами, мати афінність, достатню для зв'язування низької концентрації імуноліпосом та мати низьку імуногенність. З цією метою використовуються химерні і гуманізовані МКАТ, а також Fab-фрагменти антитіл. Антитіла мусять ефективно інтерналізуватися клітинами-мішенями через ендоцитоз, характеризуватися біологічною активністю і підсилювати протипухлинну відповідь. МКАТ повинні бути технологічні у виробництві і мати достатній термін зберігання [49]. До антигену, який виступає мішенню для імуноліпосом, також ставляться певні вимоги: він повинен добре і гомогенно експресуватися в пухлинній тканині, бути життєво важливим для пухлинної клітини і не зникати з клітинної поверхні. Антиген повинен мінімально злушуватися з поверхні пухлинної клітини для уникнення зв'язування імуноліпосом з розчинним антигеном або посилення кліренсу. Комплекс "антиген-імуноліпосома" має пініцитуватися в пухлинну клітину. Зв'язок антитіл з ліпосомами повинен бути стабільним у крові. Лінкер не повинен зв'язуватися з місцем, яке розпізнає, на молекулі антитіл, повинен бути нетоксичний, неімуногенний і уникати опсонізації, не впливаючи на препарат у ліпосомі, стабільність ліпосомної мембрани і чинячи стеричні перешкоди.

Велике значення має співвідношення антитіл до ліпідів в імуноліпосомі [43]. Так, при ваговому співвідношенні 1:50 до однієї ліпосоми приєднувалися 24 молекули моноклональних антитіл, а при співвідношенні 1:1 — 935 молекул антитіл. Специфічне накопичення імуно-

ліпосом, які конструюються при співвідношенні 1:50, було 3 % від введеної дози, а створених при співвідношенні компонентів 1:1 – 60 % від введеної дози імуноліпосом. Захоплення імуноліпосом клітинами печінки знижувалося з 50 % від введеної дози для ліпосом з низьким вмістом антитіл до 12 % для ліпосом з високим вмістом антитіл. При цьому захоплення імуноліпосом, в яких міститься низька кількість антитіл, не відрізнялося від захоплення звичайних ліпосом. Імуноліпосоми, які не зв'язалися з клітинами-мішенями при перших кількох пасажах через пухлинні капіляри, накопичувалися в печінці і селезінці [43].

Специфічна доставка протипухлинних препаратів за допомогою імуноліпосом сприяла кращій терапевтичній ефективності і зниженню токсичності порівняно із звичайними ліпосомами [50]. Це було переконливо продемонстровано на моделях великих пухлин у мишей [51] на ксенотрансплантатах людської В-клітинної лімфоми у голих мишей [48].

До сьогодні описано кілька препаратів імуноліпосом, потенційно перспективних для застосування в онкологічній практиці. Вони направлені проти клітин, що експресують антигени CD71 (рецептор трансферину), Her2/neu (рецептор епідермального фактора росту) [52], HLA-DR (антигени МНС II) [53, 54], CD19 (загально-В-клітинний маркер) [48], LL2 (антиген В-клітинної лімфоми) [55].

“Троянські” пептиди. До останнього часу використання в дослідницьких і терапевтичних цілях поліпептидів і олігонуклеотидів було обмежене у зв'язку з їх низькою проникністю через біомембрани та їх відносно швидку деградацію всередині клітини. Це обмеження стало перепорою як для біомедичних досліджень, так і для фармацевтичної індустрії. Транспортування гідрофільних макромолекул у простір цитоплазми і в ядро живої клітини без руйнування мембран здавалось неможливим. У той же час, доставка біологічно активних макромолекул всередину клітини відкриває широкі перспективи для маніпулювання біологічними об'єктами. Тому відкриття пептидів, здатних проникати в клітину без наявності мембранних білків і здатних здійснювати внутрішньоклітинне транспортування зв'язаних з ними білкових фрагментів і олігонуклеотидів, відкриває новий етап у розвитку біології і медицини. Такі пептиди дістали назву “cell penetrating peptide” – пептиди, які проникають у клітину (ППК) [56–58]. Іноді ППК називаються ще “троянськими” пептидами.

ППК виділені з білків різних організмів від вірусів (ВІЛ-1, герпесу, грипу) до хребетних (кайман). Пенетратин (pANTP), пептид з 16 амінокислот, отриманий з білка Antennapedia *Drosophila melanogaster* [56], є типовим і найбільш вивченим представником ППК. Фрагментом капсидного білка вірусу імунодефіциту ВІЛ-1 є пептид TAT [57, 58], а вірусу простого герпесу – пептид VP22 [59].

За фізико-хімічними властивостями ППК можна розділити на дві групи: гідрофобні (FGF глікопротеїна саркоми Капоши, gp41 глікопротеїна ВІЛ-1 і Ig(v) легкого ланцюга імуноглобуліну каймана) і амфіфільні (Hel 11-7 гемаглютиніна вірусу грипу, TAT, VP22 і pANTP). Довжина таких пептидів коливається від 11 до 30 амінокислот. Аналіз амінокислотних послідовностей “троянських” пептидів не виявив їх гомології, проте було помічено, що в них майже завжди є кілька молекул аргініну. Виявлення такої закономірності дало можливість дослідникам розглядати інтерналізацію як властивість пептидів, багатих на аргінін. Проте пізніше було синтезовано амінокислотні послідовності без вмісту аргініну, але які здатні проникати через мембрани цитоплазми [60].

Механізм транспортування ППК через клітинну мембрану в даний час незрозумілий. Проте відомо, що він відбувається без наявності мембранних білків, практично не залежить від характеру експресії вуглеводів і енергетично незалежний [61]. Деякі “троянські” пептиди (TAT і VP22) здатні проникати через внутрішньоклітинні мембрани і накопичуватися в ядрі клітини. Експериментально доведено, що ППК з однаковою ефективністю пенетрують у клітини різних типів, і навіть здатні долати гістогематичні бар'єри у ссавців [62].

Виявилось, що дані пептиди можуть переносити через мембрану клітини ковалентно зв'язані з ними амінокислотні і олігонуклеотидні послідовності з молекулярною масою до кількох кДа і які тривалий час не піддаються внутрішньоклітинному гідролізу, оскільки знаходяться поза зоною дії лізосомальних ферментів. Таким чином, “троянські” пептиди можуть виступати в ролі механізму транспортування фізіологічно активних ділянок макромолекул у цитоплазму і навіть в ядро клітини [63]. Такі унікальні властивості ППК дали можливість цілеспрямовано створювати химерні молекули, що складаються з “троянського” пептиду і ковалентно з ним зв'язаного фрагмента макромолекули [62, 63].

Висновки

У даній статті зроблено огляд сучасної літератури щодо підходів до створення систем цілеспрямованої доставки антиканцерогенних і вакцинних препаратів та засобів для генотерапії. Одним з найбільш ефективних підходів до специфічної доставки лікарських засобів до клітин-мішеней є рецептор-опосередкований ендоцитоз як виключно вибіркового концентрувальний механізм, що дає змогу клітинам захоплювати значні кількості специфічних лігандів без поглинання великого об'єму позаклітинної рідини. Як вектори використовуються різноманітні білки, здатні до специфічної взаємодії, зокрема трансферрин, гормони (наприклад, гонадоліберин, інсулін), онкофетальні білки,

(зокрема, α -фетопротейн та епідермальний фактор росту), а також пептиди, які характеризуються здатністю проникати в клітину. Поширення набувають імуноліпосоми, які як вектори містять моноклональні антитіла до рецепторів ракових клітин. Важливими перевагами використання систем цілеспрямованої доставки лікарських субстанцій на основі рецептор-опосередкованого ендоцитозу є підвищення терапевтичної ефективності та зменшення токсичності, що особливо актуально у випадку протиракових препаратів.

Подальший аналіз може стосуватись вивчення технологій промислового виготовлення лікарських засобів на основі рецептор-опосередкованого ендоцитозу.

А.Ю. Галкин, Л.Б. Бондаренко, А.М. Дуган

СОЗДАНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ НА ОСНОВЕ РЕЦЕПТОР-ОПОСРЕДОВАННОГО ЭНДОЦИТОЗА БИОЛОГИЧЕСКИ-AKТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Обобщены литературные данные относительно подходов к созданию систем целенаправленной доставки лекарственных средств, основанных на использовании рецептор-опосредованного эндоцитоза. Рассмотрены подходы к использованию систем направленной доставки при создании антиканцерогенных, антибактериальных, вакцинных препаратов, а также в генотерапии.

O.Yu. Galkin, L.B. Bondarenko, O.M. Dugan

OBTAINING AND USING OF DOSAGE FORMS BASED ON RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES

This study sums up the data on various approaches to creating targeted drug delivery systems based on the use of receptor-mediated endocytosis. We shed some light on approaches to using targeted drug delivery systems for developing anticancer, antibacterial, and vaccine preparations, as well as in gene therapy.

1. *Ranade V.V., Hollinger M.A.* Drug delivery systems. — CRC Press, 2003. — 520 p.
2. *Северин Е.С., Родина А.В.* Проблемы и перспективы противоопухолевой терапии // Успехи биологической химии. — 2006. — **46**. — С. 43–64.
3. *Alberts B.* Essential Cell Biology, 2nd Edition. — New York: Garland Science, 2005. — 340 p.
4. *Howe C.L.* Modeling the Signaling Endosome Hypothesis: Why a Drive to the Nucleus Is Better Than a (Random) Walk // Theor. Biol. Med. Mod. — 2005. — N 2. — P. 43.
5. *Kholodenko B.N.* Four-Dimensional Organisation of Protein Kinase Signaling Cascades: the Roles of Diffusion, Endocytosis and Molecular Motors // J. Exp. Biol. — 2003. — **206**. — P. 2073–2082.
6. *Yang J., Chen H., Vlahov I.R. et al.* Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated endocytosis by using FRET imaging // Proc. of National Academy of Sciences of United States. — 2006. — **103**, N 37. — P. 13872–13877.
7. *Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E.* Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model // Science. — 1998. — **279**. — P. 377–380.
8. *Hermanson G.T.* Bioconjugate techniques. — San Diego: Academic Press, 2000. — 760 p.
9. *Misra A., Ganesh S., Shahiwala A. et al.* Drug delivery to the central nervous system: a review // J. Pharm. Pharm. Sci. — 2003. — **6**. — P. 252–273.
10. *Cheng Y., Zak O., Aisen P. et al.* Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex // Cell. — 2004. — **6**. — P. 565–576.
11. *Aisen P.* Transferrin, the transferrin receptor and the uptake of iron by cells // Metal. Ions Biol. Syst. — 1998. — **35**. — P. 535–631.

12. Qian Z.M., Li H., Sun H. et al. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway // *Pharmacol. Rev.* – 2002. – **54**. – P. 561–587.
13. Dharap S.S., Wang Y., Chandna P. et al. Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – **102**. – P. 12962–12997.
14. Grundker C., Huschmand N.A., Emons G. Gonadotropin-releasing hormone receptor-targeted gene therapy of gynecologic cancers // *Mol. Cancer. Ther.* – 2005. – **4**. – P. 225–231.
15. Ефимов А.С., Бездробный Ю.В. Структура и функции инсулиновых рецепторов. – К.: Наук. думка, 1987. – 168 с.
16. Frittitta L., Sciacca L., Catalfamo R. et al. Functional insulin receptors are overexpressed in thyroid tumors // *Cancer.* – 1999. – **85**. – P. 492–498.
17. Vella V., Sciacca L., Pandini G. et al. The IGF system in thyroid cancer: new concepts // *J. Clinical Pathology.* – 2001. – **54**, N 3. – P. 121–124.
18. Belfiore A., Pandini G., Vella V. et al. Insulin/IGF-I hybrid receptors play a major role in IGF-I signaling in thyroid cancer // *Biochemie.* – 1999. – **81**. – P. 403–407.
19. Sciacca L., Costantino A., Pandini G. et al. Insulin receptor activation by IGF-II in breast cancers: evidence for a new autocrine/paracrine mechanism // *Oncogene.* – 1999. – **18**. – P. 2471–2479.
20. Лакин В.В. Белково-пептидные гормоны. Биохимическая фармакология. – М., 1982. – С. 228–244.
21. Vajo Z., Duckworth W.C. Genetically Engineered Insulin Analogs: Diabetes in the New Millenium // *Pharmacological Rev.* – 2000. – **52**, N 1. – P. 1–10.
22. Маслов Д.Л., Прозоровский В.Н. Исследование способности липосом, модифицированных синтетическими фрагментами инсулина, специфически взаимодействовать с клетками PC 12 // *Вопр. медицинской химии.* – 2000. – № 4. – С. 377–383.
23. Kolb H.J., Renner R., Hepp K.D. et al. Re-evaluation of Sepharose-insulin as a tool for the study of insulin action // *Proc. of National Academy of Sciences of United States.* – 1975. – **72**, N 1. – P. 248–252.
24. Moro R., Tamaoki T., Wegmann T.G. et al. Monoclonal antibodies directed against a widespread oncofetal antigen: the alpha-fetoprotein receptor // *Tumour Biol.* – 1993. – **14**. – P. 116–130.
25. Ницетов М.Б., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А. и др. Изучение экспрессии рецептора альфа-фетопротеина в опухолевых и нормальных тканях человека с помощью иммуногистохимического метода // *Иммунология.* – 2005. – № 2. – С. 122–125.
26. Severin S.E., Moskaleva E.Yu., Shmyrev I.I. et al. α -fetoprotein-mediated targeting of anti-cancer drugs to tumor cells in vitro // *Biochem. Mol. Biol.* – 1995. – **Int. 37**. – P. 385–392.
27. Sveshnikov P.G., Grozdova I.D., Nesterova M.D. Protein Kinase A: Regulation and Receptor-Mediated Delivery of Antisense Oligonucleotides and Cytotoxic Drugs // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2002. – **968**, N 1. – P. 158–172.
28. Sotnichenko A.I., Zabolotnev D.V., Severin S.E. A New Efficient Technology for the Isolation of Human α -Fetoprotein and the Status of Free Sulfhydryl and Amino Groups in the Resulting Preparation // *Russian J. Bioorg. Chem.* – 2001. – **27**. – P. 213–217.
29. Родина А.В., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А. и др. Сравнение цитотоксической активности конъюгатов доксорубина с α -фетопротеином и эпидермальным фактором роста в отношении чувствительных и резистентных к доксорубину клеточных линий // *Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии.* – 1998. – № 3. – С. 20–25.
30. Луценко С.В., Финакова Г.В., Фельдман Н.Б. и др. Направленная доставка к клеткам-мишеням и цитотоксическая противоопухолевая активность окта-4,5-карбокситаллоцианина (терафтал) // *Там же.* – № 1. – С. 34–37.
31. Луценко С.В., Фельдман Н.Б., Финакова Г.В. и др. Направленный транспорт фталлоцианина (СО) к опухолевым клеткам-мишеням с помощью α -фетопротеина и эпидермального фактора роста // *Там же.* – 1999. – № 1. – С. 40–44.
32. Савицкий А.А., Гукасова Н.В., Гуманов С.Г. и др. Цитотоксическое действие конъюгатов альфа-фетопротеина и эпидермального фактора роста с фотогомом, хлоринами и фталлоцианинами // *Биохимия.* – 2000. – **65**. – С. 859–864.
33. Гуманов С.Г., Гукасова Н.В., Родина А.В. и др. Цитотоксическая активность, накопление и внутриклеточное распределение доксорубина и его конъюгата с эпидермальным фактором роста в чувствительных и резистентных к доксорубину опухолевых клетках // *Вопр. биологической, медицинской и фармацевтической химии.* – 2000. – № 2. – С. 17–22.
34. Луценко С.В., Финакова Г.В., Фельдман Н.Б. и др. Рецепторопосредованный токсический эффект конъюгата эпидермального фактора роста с доксорубином в отношении опухолевых клеток // *Там же.* – 1998. – № 1. – С. 21–25.
35. Фельдман Н.Б., Луценко С.В., Финакова Г.В. и др. Повышение противоопухолевой активности доксорубина за счет его адресной доставки к клеткам-мишеням с помощью белковых векторов // *Там же.* – 1999. – № 1. – С. 44–48.
36. Bach M., Hölig P., Schlosser E. et al. Isolation from phage display libraries of lysine-deficient human epidermal growth factor variants for directional conjugation as targeting ligands // *Protein Engineering.* – 2003. – **16**, N 12. – P. 1107–1113.

37. *Lutsenko S.V., Feldman N.B., Finakova G.V. et al.* Anti-tumor Activity of Alpha Fetoprotein and Epidermal Growth Factor Conjugates in vitro and in vivo // *Tumor Biol.* – 2000. – **21**. – P. 367–374.
38. *Grandis J.R., Melhem M.F., Gooding W.E. et al.* Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival // *J. National Cancer Institute.* – 1998. – **90**. – P. 824–832.
39. *Gleave M.E., Monia B.P.* Antisense therapy for cancer // *Nature Reviews Cancer.* – 2005. – **5**. – P. 468–479.
40. *Sharkey R.M., Goldenberg D.M.* Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates // *CA Cancer J. Clin.* – 2006. – **56**. – P. 226–243.
41. *Moos T., Morgan E.H.* Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood-brain barrier in the rat // *Neurochem.* – 2001. – **79**. – P. 119–129.
42. *Барышников А.Ю., Оборотов Н.А.* Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов // *Соврем. онкология.* – 2003. – **3**, № 2. – С. 12–15.
43. *Maruyama K.* In vivo targeting by liposomes // *Biol. Pharm. Bull.* – 2000. – **23**. – P. 791–799.
44. *Wright S., Huang L.* Antibody directed liposomes as drug delivery vehicles // *Advanced Drug Delivery Reviews.* – 1989. – **3**. – P. 343–389.
45. *Torchilin V.P., Klibanov A.L., Huang L. et al.* Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium // *FASEB J.* – 1992. – **6**. – P. 2716–2719.
46. *Huang L., Zhou F.* Liposome and immunoliposome mediated delivery of proteins and peptides / *Targeting of Drugs 3: The Challenge of Peptides and Proteins* / Editors G. Gregoriadis, A.C. Allison, G. Poste. – NATO Advanced Study Institute Series, Plenum., 1992. – P. 45–50.
47. *Alien T.M., Brandeis E., Hansen C.B. et al.* A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – **1237**. – P. 99–108.
48. *Lopes de Menezes D.E., Pilarski L.M., Belch A.R. et al.* Selective targeting of immunoliposomal doxorubicin against human multiple myeloma in vitro and ex vivo // *Ibid.* – 2000. – **1466**, N 1-2. – P. 205–220.
49. *Kirpotin D., Park J.W., Hong K. et al.* Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro // *Biochemistry.* – 1997. – **36**. – P. 66–75.
50. *Lasic D.D., Papahadjopoulos D.* Liposomes revisited // *Science.* – 1995. – **267**. – P. 1275–1276.
51. *Park J.W., Hong K., Kirpotin D.B. et al.* Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced anticancer efficacy due to targeted delivery // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – **8**. – P. 1172–1181.
52. *Papahadjopoulos D., Kirpotin D.B., Park J.W. et al.* Targeting of drugs to solid tumors using anti-HER2 immunoliposomes // *J. Liposome Research.* – 1998. – **8**, N 4. – P. 425–442.
53. *Dufresne I., Desormeaux A., Bestman-Smith J. et al.* Targeting lymph nodes with liposomes bearing anti-HLA-GR Fab' fragments // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – **1421**, N 2. – P. 284–294.
54. *Bestman-Smith J., Gourde P., Desormeaux A. et al.* Sterically stabilized liposomes bearing anti-HLA-DR antibodies for targeting the primary cellular reservoirs of HIV-1 // *Ibid.* – 2000. – **1468**, N 1-2. – P. 161–174.
55. *Lundberg B.B., Griffiths G., Hansen H.J.* Specific binding of sterically stabilized anti-B-cell immunoliposomes and cytotoxicity of entrapped doxorubicin // *Int. J. Pharm.* – 2000. – **205**, N 1-2. – P. 101–108.
56. *Derossi D., Joliot A., Chassaing G. et al.* The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through membranes // *J. Biol. Chem.* – 1994. – **269**. – P. 10444–10450.
57. *Frankel A.D., Pabo C.O.* Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus // *Cell.* – 1988. – **55**. – P. 1189–1193.
58. *Green M., Loewenstein P.M.* Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein // *Ibid.* – P. 1179–1188.
59. *Eliot G., O'Hare P.* Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein // *Ibid.* – 1997. – **24**. – P. 223–233.
60. *Futaki S.* Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms // *Int. J. Pharmaceutics.* – 2002. – **245**. – P. 1–7.
61. *Drin G., Temsamani J.* Physico-chemical requirements for cellular uptake of pANTP peptide: role of lipid-binding affinity // *Eur. J. Biochem.* – 2001. – **268**. – P. 1304–1314.
62. *Morris M.C., Depollier J., Mery J. et al.* A peptides carrier for the delivery of biologically active proteins in mammalian cells // *Nat. Biotechnology.* – 2001. – **19**. – P. 1173–1176.
63. *Wadia J.S., Dowdy S.F.* Protein transduction technology // *Curr. Opin. Biotechnology.* – 2002. – **13**. – P. 52–56.